Aus der Physiologisch-chemischen Anstalt
der Universität Basel

Beiträge zur Harnsäurebestimmung

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät der Universität Basel
vorgelegt von

MAURICE JUILLERAT
prakt. Zahnarzt
von Châtelat (Bern)

1930 - Buchdruckerei Alfred Schmid & Cie., Bern

Aus der Physiologisch-chemischen Anstalt
der Universität Basel

Beiträge zur Harnsäurebestimmung

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät der Universität Basel
vorgelegt von

MAURICE JUILLERAT
prakt. Zahnarzt
von Châtelat (Bern)

1930 - Buchdruckerei Alfred Schmid & Cie., Bern

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt
auf Antrag von

Prof. Dr. K. Spiro

Tag der Promotion: 10. Juli 1929

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Einleitung.

In der Literatur über die Harnsäure ist die Frage lebhaft erörtert worden, ob die Harnsäure in kolloidalem Zustand vorkommt. Schade und Boden haben dies zuerst in ihren Versuchen exakt zu beweisen gesucht. Diesem Befund gegenüber haben sich aber einige Autoren wie Lichtwitz, Gudzent und Kohler ablehnend verhalten. Schade hat seine Behauptung mit Hilfe von Opaleszenz, Tyndallphaenomen, Ultramikroskopie, Ultrafiltration und Viskositätsmessungen gestützt. Diese Methoden vermögen über die Natur der gelösten Harnsäure in einem gewissen Grade Aufschluss zu geben. Freilich ergeben die Versuche über Ultrafiltration nach Gudzent, entgegen den Untersuchungen von Schade und Boden Werte, die eine Annahme von kolloidal gelöster Harnsäure nicht berechtigen. In jüngster Zeit hat Stern zu dieser Debatte Stellung genommen und ist zu der Ansicht gekommen, dass es möglich ist, kolloidal gelöste Harnsäure herzustellen, dass dies aber offenbar sehr schwierig ist und dass es nur in hohen Konzentrationen den zwei genannten Autoren gelungen ist, zu einer kolloidalen Lösung zu gelangen. Aus der gesamten neueren Literatur (Barkan, Freundlich und L. Farmer Loeb, G. Ettisch, B. Lange, A. Jung) ergibt sich, dass sich die **Urate** wie **Kolloidelektrolyte** verhalten, auch wenn sie wegen ihrer geringen Löslichkeit nur schwer die klassischen Kolloidreaktionen geben.

Neben diesen Fragen hat in letzter Zeit auch diejenige Interesse erweckt, in welchem Verhältnis die Löslichkeit der Harnsäure zur Wasserstoffionenkonzentration steht. A. Jung hat diese Relation einer Untersuchung unterzogen und sein Ergebnis in mehreren Arbeiten niedergelegt.

Im engen Anschluss mit diesem Problem erhebt sich die Frage nach der **Zerstörung der Harnsäure**: Ich verweise auch hierfür auf die Arbeit von A. Jung, der die Literatur hierfür angibt und auch selbst Versuche darüber angestellt hat.

Vorliegende Arbeit möchte im Anschluss daran einen Beitrag liefern, durch Untersuchung der Frage, ob das Natriumfluorid auf eine Harnsäurelösung einen zersetzenden Einfluss ausübt. Das Natriumfluorid ist deshalb gewählt worden, weil es zur Gewinnung von Plasma dient, da es als kalziumfällendes Mittel die Blutgerinnung verunmöglicht, und weil es auch antiseptische Eigenschaften besitzt.

Untersuchungsmethoden.

Zur Bestimmung der Harnsäure habe ich in allen Fällen von der Mikromethode von Folin und Denis Gebrauch gemacht.

Vergleichende Versuche mit andern Methoden haben mir ihre Vorzüge klar dargetan. Sie zeigt eine grosse Genauigkeit und ist relativ einfach in der Handhabung. Die gleichen Vorzüge scheint mir auch diejenige von Benedict aufzuweisen. Die Werte, welche ich anhand dieser Methoden festgestellt habe, decken sich praktisch.

Dagegen ist die Silberlactatmethode von Folin (Isoliermethode) viel weniger genau und dazu bedeutend kostspieliger. Mit diesen Mikromethoden habe ich dann die Makromethode von Folin und Shaffer verglichen. Abgesehen davon, dass man bei dieser Methode grosse Quantitäten der zu untersuchenden Lösung benötigt und sie kompliziert und zeitraubend ist, scheint sie absolut unzuverlässig, und ist daher wohl zu verwerfen.

Als Beleg seien folgende Zahlen angegeben, die eine Bestimmung des Harnsäuregehaltes ein und derselben Lösung mit den verschiedenen Methoden ergab.

Methoden:	Folin und Denis	Benedict	Isoliermethode Folin	Makromethode Folin u. Shaffer
Gr in L	0,35	0,34	0,22	0,047

Auf einen speziellen Punkt soll noch eingegangen werden. Die Methoden von Folin und Denis und von Benedict zeigen neben ihren Vorzügen oft auch eine unangenehme Eigenschaft: das Auftreten eines Niederschlages in der Versuchslösung, oft auch in der Standardlösung, bei mittleren Konzentrationen. Durch diesen wird sehr oft eine Bestimmung unmöglich gemacht, da es unzulänglich ist, eine solche Lösung kolorimetrisch zu vergleichen. Das Auftreten des Niederschlages ist bedingt einmal durch das Verhältnis des gebrauchten Harnsäurereagenses zur gelöst vorhandenen Harnsäure, dann durch

das Verhältnis des gleichen Reagenses zur Konzentration der verwendeten Natriumcyanidlösung.

Arbeitet man nach den Vorschriften von Folin und Denis, so wird man weder in konzentrierten, noch in stark verdünnten Lösungen die störenden Niederschläge erhalten, sondern nur bei mittleren Konzentrationen (etwa zwischen 40 mg und 10 mg %). In meinen Versuchen habe ich feststellen können, dass sie auch da verschwinden, wenn man bei der Ausführung der Methode von Folin und Denis an Stelle der von den beiden Autoren angegebenen 15 prozentigen Natriumcyanidlösung eine 5 prozentige gebraucht, wie sie Benedict bei seiner Methode vorschreibt.

I. Versuche an gesättigter Harnsäurelösung.

Um die Wirkung des Natriumfluorids auf die Harnsäure studieren zu können, wurden Lösungen hergestellt, die sowohl mit Harnsäure als auch mit Natriumfluorid gesättigt waren.

Herstellung der Lösungen.

Alle Lösungen wurden kalt hergestellt. Zu destilliertem Wasser wurde Harnsäure und Natriumfluorid im Ueberschuss gegeben und die entstandene Lösung 4 Stunden geschüttelt, alsdann gleich filtriert und in eine Flasche gebracht, deren Stöpsel mit einer Schicht Paraffin übergossen wurde.

Diese gesättigten Harnsäure-Natriumfluoridlösungen wurden nun gleich nach ihrer Herstellung auf ihren Harnsäuregehalt geprüft, dann stehen gelassen und in gewissen Zeitabständen wieder analysiert. Bei allen Versuchen betrug die maximal erreichbare Konzentration 0,89 gr/L, d. h. 89 mgr für 100 ccm Flüssigkeit. Die Werte schwanken zwischen 0,89 gr/L und 0,81 gr/L.

In wiederholten Gehaltsbestimmungen zeigte sich, dass die Harnsäurekonzentration in der Lösung langsam abnahm. Wir wollen gleich bemerken, dass die ursprünglich klare Flüssigkeit oft schon 24 St. nach ihrer Herstellung, allerdings ganz schwache Ausfällungen zeigte, die mit dem Abnehmen der gelösten Harnsäure aber zunahmen. Auf die Natur des Niederschlages werden wir später zurückkommen.

Die Abnahme der Harnsäure beträgt nach einem Tage schon etwa 0,1 gr/L. Nach 24 St. verzeichnen wir nämlich 0,74 gr Harnsäure pro L der ursprünglich gesättigten Lösung, nach 3 Tagen 0,33 gr/L, nach 8 Tagen 0,17 gr/L und nach 19 Tagen nur noch 0,009 gr/L. Dies nur ein Beispiel. Späterfolgende Tabellen werden diese Abnahme ebenfalls illustrieren. Wir sehen, dass die Abnahme besonders in der frischen Lösung rasch vor sich geht. Zeichnen wir die Konzentration als Ordinate und die Zeit als Abszisse, so erhalten wir eine zuerst steil abfallende, dann allmählich sich ausstreckende Kurve.

Es stellt sich nun die Frage, ob das Verschwinden der Harnsäure durch das Natriumfluorid bedingt wird, oder ob dabei andere Momente in Betracht fallen. Unter diesen Momenten könnte man sowohl an Mikroorganismen, als auch an chemische Wirkungen des Lichtes denken.

Mikroorganismen.

Verschiedene Bakterienarten, welche im Boden vorkommen, vermögen die Harnsäure unter Wasserabspaltung in einfachere Körper zu zerlegen, z. B. in Ammoniumbicarbonat und Kohlensäure, oder in Harnstoff und Tartronsäure, oder auch in Harnstoff und Kohlensäure.

So schien es nicht ausgeschlossen, dass die Abnahme der Harnsäure auf die Anwesenheit von gegen Natriumfluorid widerstandsfähigen Mikroorganismen zurückzuführen sei. Daher wurden sämtliche hergestellten Versuchslösungen im Autoklaven 1 Stunde bei 120° C sterilisiert. Dabei hat sich gezeigt, dass das Verschwinden der Harnsäure bei sterilisierten Lösungen ebenso rasch vor sich ging wie bei den unsterilisierten. Harnsäurevergärende Mikroorganismen als Ursache dürften daher bei diesen Experimenten nicht in Frage kommen, zumal Natriumfluorid ein ausgezeichnetes Antisepticum ist.

Licht.

Um die Wirkung des Lichtes auf die Harnsäure festzustellen, wurden 100 ccm einer Harnsäurevergleichslösung 1 : 1000 (1 gr/L) direktem Sonnenlicht ausgesetzt und davon 1 ccm mit 1 ccm der unbelichteten Stammlösung verglichen. Nach einer 6 stündigen Exposition waren die 100 ccm durch Verdampfen in breiter Schicht auf 71 ccm eingeengt worden.

In 1 ccm dieser eingeengten Lösung wurden 1,11 mgr Harnsäure festgestellt. In den 71 ccm waren demnach noch 78,81 mgr Harnsäure vorhanden, gegen 100 mgr in den ursprünglichen 100 ccm. Ungefähr das gleiche konnten wir anhand eines andern Versuches feststellen. Expositionszeit 6½ Stunden, Verdampfen der 100 ccm auf 74 ccm, Abnahme der Harnsäure von 100 mgr auf 75,48 mgr.

Dieselben Versuche wurden auch wiederholt, indem man die Harnsäurevergleichslösung anstelle der Einwirkung der Sonne, den ultravioletten Strahlen aussetzte. Hier betrug die Abnahme nach einer 2½ stündigen Einwirkungsdauer 10 mgr, d. h. es waren nur noch 90 mgr von 100 in der Lösung vorhanden.

Bei diesen Experimenten wurde die Exposition in ungedeckten Abdampfschalen vorgenommen. Merkwürdigerweise hat die Harnsäure gar nicht oder nur minimal abgenommen, wenn man, wie das weitere Versuche zeigten, die Schalen mit einer Glasscheibe zudeckte. Eine Erklärung für dieses merkwürdige Verhalten vermag ich nicht zu geben, wohl aber scheint mir berechtigt, anzunehmen, dass bei geschlossenen Flaschen, die nicht direkt dem Sonnenlicht ausgesetzt sind, eine Abnahme durch Lichteinwirkung nicht zu befürchten ist.

Natriumfluorid.

Es wäre denkbar, dass das Fluorion eine katalytische Wirkung im Sinne einer Oxydation ausübt, dadurch könnte die Harnsäure zersetzt werden. Aus diesem Grunde habe ich eine gesättigte Harnsäure-Fluornatriumlösung einer intensiven Sauerstoffeinwirkung ausgesetzt. Von zwei am gleichen Tag hergestellten Lösungen wurde die eine täglich mit Sauerstoff durchströmt. Vergleichende Gehaltsbestimmungen ergaben fast übereinstimmende Resultate für beide Lösungen:

Gehalt an Harnsäure in gr/L	Kontrollösung	mit Sauerstoff durchströmte Lösung	Zeit der Sauerstoffeinwirkung
Gehalt am Herstellungstag	0,88	0,88	—
Nach 2 Tagen	0,592	0,57	1 Stunde
Nach 4 Tagen	0,339	0,312	4 h 10 '
Nach 5 Tagen	0,224	0,201	7 h 40 '
Nach 8 Tagen	0,168	0,181	8 h 55 '

Durch diese Resultate ist dargetan, dass die Abnahme der Harnsäure nicht durch einen Ueberschuss an Sauerstoff beeinflusst wird. In der der Sauerstoffeinwirkung ausgesetzten Lösung betragen sie praktisch gleich viel wie in der mit Paraffin luftdicht abgeschlossenen Kontrollösung.

Es ist weiter oben erwähnt worden, dass nach einiger Zeit in allen untersuchten Lösungen ein Niederschlag sich zeigte. Diesen zu untersuchen bildete die nächste Aufgabe. Qualitative Analysen haben ergeben, dass es sich tatsächlich um ausgefällte Harnsäure handelt.

Untersuchung des Niederschlages auf Harnsäure.

Um zu quantitativen Ergebnissen zu gelangen, wurde folgendermassen vorgegangen:

10 ccm einer frisch hergestellten, gesättigten Harnsäure-Natriumfluoridlösung wird in ein Zentrifugenglas gegossen und dieses gut verschlossen aufbewahrt. Die Analysen konnten beginnen, sobald ein Niederschlag sich zeigte. Dieser schien nach einem Monat in genügender Menge vorhanden zu sein. Bei den Analysen wurde erst zentrifugiert und hernach der Gehalt an Harnsäure in 10 ccm der überstehenden Lösung bestimmt. Es waren nur mehr 0,54 mgr darin vorhanden, während am Tage der Herstellung die Analyse 8,5 mgr ergab.

Der Niederschlag, 3 mal mit destilliertem Wasser zentrifugiert und gewaschen, wurde in 10 ccm Wasser aufgenommen und in einem Kjeldahlglas nach Beigabe von etwas Lithiumcarbonat erhitzt, bis er sich vollständig gelöst hatte. Die Bestimmung ergab, dass sich darin 1,46 mgr Harnsäure befand.

Diesem Versuch können wir folgendes entnehmen: Nach einem Monat trat in der 10 ccm Versuchslösung ein Defizit von 6,5 mgr Harnsäure auf. Daraus ist ersichtlich, dass die Harnsäure in irgend einer Weise zerstört worden ist.

Untersuchung der überstehenden Flüssigkeit.

Die überstehende Flüssigkeit wurde untersucht auf

Ammoniak	(qualitativ)
Harnstoff	„
Allantoin	(quantitativ)
Oxalsäure	„

Diese 4 Körper waren darin nicht nachzuweisen.

II. Versuche mit Blut.

Menschliches Blut.

Bei diesen Versuchen hat es sich darum gehandelt, neben der Wirkung des Natriumfluorids auf die Harnsäure des Blutes, auch den Gehalt an Harnsäure in den roten Blutkörperchen durch Berechnung aus dem Gehalt des Gesamtblutes und des Serums zu bestimmen.

Zu diesem Zwecke wurde in mehrere sterilisierte Kölbchen je eine kleine Menge Natriumfluorid (75—100 mgr) und etwa 70—100 ccm Aderlassblut von ein und demselben Individuum gegeben. Die Anwesenheit des Natriumfluorids im Blute verhinderte die Gerinnung. Gleich nach dem Aderlass wurde die Harnsäurebestimmung im Gesamtblute und im Serum vorgenommen. Die mit einem sterilen Wattepfropf sorgfältig verschlossenen Kölbchen wurden dann im Eisschrank aufbewahrt. Nach 8 Tagen erfolgte eine zweite Bestimmung.

Diese Versuche waren mit grossen Schwierigkeiten verbunden. Die zugegebene Natriumfluoridmenge musste nämlich mindestens so gross sein, dass die Gerinnung des Blutes nicht eintreten konnte, anderseits durfte aber dadurch keine Hypertonie des Serums erzeugt werden. Viele Versuche wurden dadurch vereitelt, dass die Natriumfluoridmenge im Blute nicht immer im richtigen Verhältnis vorhanden war. Dadurch trat in einigen Fällen Koagulation, in vielen andern aber Hämolyse ein. Es ist uns aber trotzdem gelungen, mehrere Male hämolysefreies Blut zu bekommen. Nur in solchem einwandfreien Blute wurden dann die Bestimmungen ausgeführt. Es muss aber gleich bemerkt werden, dass auch in diesen günstigen Fällen nach 8—10 Tagen eine leichte Hämolyse aufgetreten ist. Daher habe ich es dabei bewenden lassen, am gleichen Blute nur zwei Bestimmungen durchzuführen, nämlich die eine am Tag der Blutentnahme und die andere nach 8tägigem Stehen im Eisschrank.

Für die Berechnung der in den Erythrocyten enthaltenen Harnsäure aus derjenigen des Gesamtblutes und des Serums gilt folgendes:

H = Harnsäuregehalt des Gesamtblutes pro 100 ccm
s = „ „ Serums „ 100 „
e = „ der Erythrocyten „ 100 „
a = Hämatocritwert des betreffenden Blutes.

Der durch die Bestimmung gefundene Wert s stellt die Menge Harnsäure dar, welche wir in 100 ccm Serum finden, nicht aber diejenige des Serum in 100 ccm Gesamtblut. Letztere finden wir mit Hilfe des Hämotocritwertes und benennen sie S. In 100 ccm Gesamtblut ist

$\frac{100-a}{100}$ ccm Serum vorhanden. Demnach ist $S = \frac{100-a}{100} s$ I

Wir gehen nun darauf aus, den Wert e zu berechnen, d. h. den Wert, der den Gehalt an Harnsäure von 100 ccm Erythrocyten repräsentiert.

Da in 100 ccm Gesamtblut $\frac{a}{100}$ ccm Erythrocyten vorkommen, macht der in diesen gefundene Wert $E = \frac{a}{100} e$ aus. II

Es besteht nun die Gleichung:

$H = S + E$ oder $H = \frac{100 - a}{100} s + \frac{a}{100} e$ und daraus

$$e = \frac{100\ H - (100 - a)\ s}{a} \qquad \text{III}$$

Der Hämatocritwert beim Menschen schwankt um 40—48 herum. Will man diesen nicht für jeden einzelnen Menschen bestimmen, sondern nimmt man den Mittelwert 45, so lässt sich die Formel noch vereinfachen. Es ist dann:

$$e = \frac{20\ H - 11\ s}{9}$$

Gestützt auf die Berechnungen aus den festgesetzten Werten von Gesamtblut und Serum konnten wir zeigen, dass in den roten Blutkörperchen tatsächlich Harnsäure enthalten war. Der Gehalt schwankt aber, wie das auch in der Literatur mehrfach festgestellt wurde. Nachfolgend einige Zahlen, die am Tage der Blutentnahme im Blute von zwei verschiedenen Individuen bestimmt wurden. Die Gerinnung wurde nicht nur mit Natriumfluorid, sondern auch mit Natriumcitrat und Natriumoxalat verhindert. In einem salzfreien Kölbchen liess ich auch immer eine gewisse Menge Blut gerinnen, um den Harnsäuregehalt im Serum des durch Salze unbeeinflussten Blutes zu ermitteln.

Blut I

Dem Blute zugesetzt	mgr Harnsäure in 100 ccm		
	Serum resp. Plasma	Gesamtblut	Erythrocyten
Spontane Gerinnung	7,252	—	—
Natriumfluorid	5,98	4,848	3,464
Natriumcitrat	6,252	5,948	5,576
Natriumoxalat	6,176	4,52	2,496

Blut II

Dem Blute zugesetzt	mgr Harnsäure in 100 ccm		
	Serum resp. Plasma	Gesamtblut	Erythrocyten
Spontane Gerinnung	6,142	—	—
Natriumfluorid	7,62	5,196	2,24
Natriumcitrat	6,896	5,88	4,6
Natriumoxalat	7,618	5,0	1,8

Die vorstehend angegebenen Werte des Serums resp. Plasmas und der Erythrocyten geben keinen Aufschluss über das Verhältnis, in welchem im Gesamtblute die Harnsäure des Serums zu derjenigen der roten Blutkörperchen steht. Sie müssen zuerst umgerechnet werden in S und E, da wir erst durch die Gleichung $H = S + E$ zu einem Vergleich kommen können. Wir gelangen durch Gleichung I und II von s und e zu S und E.

$$S = \frac{100 - a}{100} s \qquad E = \frac{a}{100} e$$

Die folgenden Tabellen geben auch diese umgerechneten Werte und die Resultate der nach 8 Tagen erfolgten zweiten Bestimmungen.

Natriumfluorid **Blut I**

	mg Harnsäure in				
	100 ccm Serum	100 ccm Erythrocyten	100 ccm Gesamtblut	Serum von 100 ccm Gesamtblut	Erythr. von 100 ccm Gesamtblut
Tag der Blutentn.	5,98	3,464	4,848	3,289	1,559
Am 8. Tag	5,627	2,483	4,212	3,095	1,117

Natriumcitrat

	mg Harnsäure in				
	100 ccm Serum	100 ccm Erythrocyten	100 ccm Gesamtblut	Serum von 100 ccm Gesamtblut	Erythr. von 100 ccm Gesamtblut
Tag der Blutentn.	6,252	5,576	5,948	3,439	2,509
Am 8. Tag	6,152	1,716	4,156	3,384	0,772

Natriumoxalat

	mg Harnsäure in				
	100 ccm Serum	100 ccm Erythrocyten	100 ccm Gesamtblut	Serum von 100 ccm Gesamtblut	Erythr. von 100 ccm Gesamtblut
Tag der Blutentn.	6,176	2,496	4,52	3,397	1,123
Am 8. Tag	4,396	3,747	4,104	2,418	1,686

Es folgt nun eine Tabelle, in der die Werte des Natriumfluorid, Natriumcitrat und Natriumoxalatblutes zum Vergleich nebeneinander gestellt sind:

Blut I

	mg Harnsäure in								
	im Serum von 100 ccm Gesamtblut			in Erythrocyten von 100 ccm Gesamtblut			in 100 ccm Gesamtblut		
	NaF	Na-citrat	Na-oxalat	NaF	Na-citrat	Na-oxalat	NaF	Na-citrat	Na-oxalat
Tag der Blutentn.	3,289	3,439	3,397	1,559	2,509	1.123	4,848	5,948	4,52
Am 8. Tag	3,095	3,384	2,418	1,117	0,772	1,686	4,212	4,156	4,104

Nachstehende Resultate stammen von Untersuchungen am Blute eines zweiten Individuums.

Blut II — **Natriumfluorid**

	mg Harnsäure in				
	100 ccm Serum	100 ccm Erythrocyten	100 ccm Gesamtblut	Serum von 100 ccm Gesamtblut	Erythr. von 100 ccm Gesamtblut
Tag der Blutentn.	7,62	2,233	5,196	4,192	1,004
Am 8. Tag	5,94	3,518	4,85	3,267	1,583

Natriumcitrat

	mg Harnsäure in				
	100 ccm Serum	100 ccm Erythrocyten	100 ccm Gesamtblut	Serum von 100 ccm Gesamtblut	Erythr. von 100 ccm Gesamtblut
Tag der Blutentn.	6,896	4,638	5,88	3,793	2,087
Am 8. Tag	5,16	3,249	4,3	2,838	1,462

Natriumoxalat

	mg Harnsäure in				
	100 ccm Serum	100 ccm Erythrocyten	100 ccm Gesamtblut	Serum von 100 ccm Gesamtblut	Erythr. von 100 ccm Gesamtblut
Tag der Blutentn.	7,618	1,8	5,0	4,184	0,81
Am 8. Tag	6,2	2,44	4,508	3,41	1,098

Zusammengestellte Tabelle

	mg Harnsäure								
	im Serum von 100 ccm Gesamtblut			in Erythrocyten von 100 ccm Gesamtblut			in 100 ccm Gesamtblut		
	NaF	Na-citrat	Na-oxalat	NaF	Na-citrat	Na-oxalat	NaF	Na-citrat	Na-oxalat
Tag der Blutentn.	4,192	3,793	4,184	1,004	2,087	0,81	5,196	5,88	5,0
Am 8. Tag	3,267	2,838	3,41	1,583	1,462	1,098	4,85	4,3	4,508

Aus diesen Versuchen können wir den Schluss ziehen, dass die Gegenwart des Natriumfluorids (ebenfalls des Natriumcitrates oder des Natriumoxalates) auf die Abnahme der Harnsäure im Blut einen Einfluss ausübt. Diese ist nämlich geringer im Serum des spontan geronnenen als im Serum des mit Natriumfluorid versetzten Blutes:

Blut I

	mg Harnsäure	
	Serum des spontan geronnenen Blutes	Serum des Natrium-fluorid-blutes
Tag der Blutentn.	7,252	5,98
Am 8. Tag	7,188	5,627

Blut II

	mg Harnsäure	
	Serum des spontan geronnenen Blutes	Serum des Natrium-fluorid-blutes
Tag der Blutentn.	6,325	7,62
Am 8. Tag	6,142	5,94

Es lässt sich ferner konstatieren, dass die Abnahme der Harnsäure im Blute mit Natriumfluoridzusatz gering ist im Vergleich zu derjenigen, welche wir in einer sowohl mit Harnsäure als auch mit Natriumfluorid gesättigten Lösung festgestellt haben. Im letzteren Fall war die Abnahme 81,12 %, während sie im Blute höchstens 12,24 % betrug.

Versuche mit tierischem Blute.

Genau die gleichen Versuche sollten sich nun auch auf das tierische Blut erstrecken. Aber in keinem einzigen von mir untersuchten Tierblut konnte ich mit der für das menschliche Blut angewandten Methode Harnsäure nachweisen, auch dann nicht, als ich überging, grössere Mengen Ausgangsmaterial zu bearbeiten. Beim Enteiweissen ging ich dermassen vor, dass ich an Stelle einer 10fachen Verdünnung nur eine 3fache verwendete. Von dem auf diese Weise enteiweissten Blute verwendete ich bei der Analyse statt 5 ccm — denen man die Harnsäurereagenzien zusetzt und mit destilliertem Wasser auf 25 ccm auffüllt — gleich 20 ccm. Dadurch erreichten wir an Stelle der üblichen

50fachen Verdünnung nur eine solche auf das 3,75fache Trozdem zeigte sich nach Hinzufügen des Folin'schen Reagenses keine Spur von Blaufärbung. Allerdings wurde das Blut nicht sofort nach der Entnahme untersucht und nach der Angabe von Folin eignet sich seine Methode weniger gut für andere Blutarten.

Die Tiere, in deren Blut ich keine Harnsäure gefunden habe, sind:

Hammel
Pferd
Schwein
Rind.

Die Versuche mit tierischem Blute wurden dann in dem Sinne abgeändert, dass man in das harnsäurefreie Blut Harnsäure einführte. Die Untersuchungen erstreckten sich nur auf das Serum. Ein Teil des Serums wurde mit Harnsäure, ein anderer Teil sowohl mit Harnsäure als mit Natriumfluorid gesättigt. Zugleich wurde zur Kontrolle eine gesättigte Harnsäure-Natriumfluoridlösung im Wasser hergestellt. Nach dem Stehenlassen dieser Lösung erfolgten im Abstand von 6 und 7 Tagen je zwei Bestimmungen. Es seien hier gleich die Resultate engegeben.

	Gesättigte Harnsäure-Natrium-fluoridlösung (Wasser)	Gesättigte Harnsäurelösung in Serum	Gesättigte Harnsäure-Natrium-fluoridlösung in Serum
	gr Harnsäure in 1 L		
Am Herstellungstag	0,899	5,68	6,85
Am 6. Tag	0,543	4,85	1,19
Am 13. Tag	0,069	0,286	0,012

Diese Zahlen bestätigen die bekannte Tatsache, dass im Serum mit seiner höhern und gepufferten Wasserstoffionenkonzentration eine viel beträchtlichere Menge Harnsäure gelöst werden kann, als in Wasser. Diese Löslichkeit steigt bei Gegenwart von Natriumfluorid noch etwas.

Wir sehen ebenfalls, dass die Abnahme der Harnsäure im Serum fast eben so rasch vor sich geht wie im Wasser, wenn die Lösungen gesättigt hergestellt wurden. Stellen wir sie graphisch dar, so haben wir in beiden Arten von Lösungen einen annähernd gleichen Verlauf der Kurve. Dabei ist aber doch nicht zu übersehen, dass im Serum mit Natriumfluoridzusatz die Harnsäure etwas rascher abnimmt.

Ich möchte hier noch beifügen, dass ich im Serum von 1 Monat gestandenem menschlichem Blute nach Allantoin gesucht habe. Es war mir aber nicht möglich, solches nachzuweisen.

Fassen wir zum Schlusse zusammen.

Sättigen wir eine gesättigte Harnsäurelösung mit Natriumfluorid, so nimmt darin die Harnsäure ab, und zwar rascher zu Beginn und rascher als ohne Zusatz.

Ein kleiner Teil der Harnsäure wird ausgefällt, während der restliche grössere Teil tatsächlich aus der Lösung verschwindet.

Es wurde in der Lösung weder Ammoniak, noch Harnstoff, Allantoin oder Oxalsäure gefunden.

Im menschlichen Blute nimmt die Harnsäure in Gegenwart von kleinen Mengen Natriumfluorid ebenfalls ab. Diese Abnahme ist aber minimal und unvergleichlich geringer als bei einer gesättigten Lösung, handle es sich um Wasser oder Serum als Lösungsmittel.

Die Gewinnung des Serums, bzw. Plasmas scheint von Einfluss zu sein auf den Nachweis der Harnsäure.

Untersuchungen über den Harnsäuregehalt des **Speichels** haben ergeben, dass dieser sehr schwankt. Wir fanden meist nur Spuren.

Anhang.

Chemische Analysen an der Zahnpulpa des Rindes.

Die Frage, ob der Schmelz des Zahnes vom Speichel her ernährt wird, oder, wie andere Untersuchungen zeigen wollten, von der Pulpa her, hat uns veranlasst, die Pulpa mikrochemisch zu untersuchen.

In dieser interessanten Aufgabe handelt es sich darum, die Menge Cholesterin, des organischen und anorganischen und Lecithinphosphors zu bestimmen. Auch Calcium und Magnesium wurden quantitativ bestimmt.

Es ist natürlich, dass diese Analysen nicht an der menschlichen Pulpa haben ausgeführt werden können, da erstens viel zu wenig Pulpasubstanz verfügbar ist und dann weil extrahierte Zähne von Menschen, wenn überhaupt noch eine vitale, so doch sicher eine alterierte Pulpa aufweisen. Man könnte nur unter Anästhesie extirpierte Pulpen — unter Arsenwirkung devitalisierte fallen natürlich ganz ausser Betracht — zur Untersuchungen heranziehen und selbst dann müsste man eine Auslese vornehmen.

Die Pulpa des Rindes eignet sich ausgezeichnet zur Ausführung von mikrochemischen Untersuchungen. Sie ist leicht zu beschaffen und zudem ist sie relativ voluminös. Um sie zu isolieren, bin ich folgendermassen vorgegangen:

Beim frisch geschlachteten Tier werden die Kiefer mit Meissel und Hammer zertrümmert und Stück für Stück vom Kieferknochen entfernt, bis man die Zähne vollständig isoliert hat. Es ist vorsichtig in dieser Weise vorzugehen, da die Zähne meist brechen, wenn man versucht, sie mit Hilfe der Zange aus dem Kiefer herauszuholen, und die Pulpa dann fast regelmässig durch Knochenmark oder am Knochen haftendes Gewebe und Fett verunreinigt wird. Die einwurzeligen Zähne kann man ebenfalls sehr gut mit Hilfe von Meissel und Hammer öffnen. Bei mehrwurzeligen Zähnen lässt sich dagegen mit Vorteil zum Oeffnen Druck gebrauchen. Am besten spannt man diese Zähne im Schraubstock ein und sprengt sie einfach auf. Die Pulpa wird dabei nicht verletzt und kann dann mit der Pinzette herausgeholt werden.

Diesbezüglich ist noch zu bemerken, dass meist einige kleine Splitter von Zahnbein an der Pulpa haften bleiben; diese müssen sorgfältig entfernt werden, was oft nur unter grosser Mühe erfolgen kann. Es ist ja zu begreifen, dass diese Splitter sehr stark am Pulpagewebe haften, da doch die äusserste Pulpaschicht, welche aus Odontoblasten besteht, durch deren Fortsätze fest im Zahnbein verankert ist. Die Pulpa muss also gleichsam vom Dentin abgerissen werden, und da ist es nicht zu verwundern, wenn die beim Aufsprengen des Zahnes losgelösten Dentinsplitter innig am Pulpagewebe haften.

Man darf nicht vergessen, dass nach dem sorgfältigsten Entfernen dieser Splitter doch noch kleine Reste davon zurückbleiben können, die dann die Calcium- und Phosphorresultate in hohem Masse zu beeinflussen vermögen.

Was nun die Ausführung der Analysen betrifft, so wurde zur Extraktion der zu analysierenden Stoffe aus der Pulpa der Tchopp'sche Mikro Universal-Apparat verwendet, der eine Modifikation des Soxhlet'schen Apparates darstellt, aber den Vorzug bietet, dass die extrahierende Flüssigkeit warm gehalten werden kann. Dies ist deshalb möglich, weil der kleine Behälter, in dem sich das zu extrahierende Material befindet, von den heissen Gasen des Extraktionsmittels umspühlt wird. Durch diese Anlage wird eine viel vollständigere und rascher durchführbare Extraktion gewährleistet.

Es seien nun gleich anschliessend die gefundenen Resultate angegeben.

1. Rind.

Freies Cholesterin	142,2 mgr	%
Anorganischer Phosphor	388 „	%
Lecithin-Phosphor	124 „	%

2. Rind.

Gesamt-Cholesterin	177,4 mgr	%
Freies Cholesterin	155 „	%
Cholesterinester	22,4 „	%
Gesamtphosphor-Lecthinphosphor . . . (Organischer anorganischer Phosphor)	101,8 „	%
Calcium	167 „	%
Magnesium	16,15 „	%

3. Rind.

Freies Cholesterin	72,8 mgr	%
Gesamt-Phosphor	94 „	%
Anorganischer Phosphor	39,4 „	%
Lecithin-Phosphor	6,43 „	%
Calcium	118 „	%
Magnesium	35,25 ,	%

Diese Untersuchungen werden in der phys. chem. Anstalt in Basel fortgesetzt werden.

Literatur.

G. Barkan: Biochem. Z. **146**, 446, 1924; Zeitschr. f. Biologie **76**, 157, 1922.

G. Ettisch, L. Farmer Loeb, B. Lange: Biochem. Z. **180**, 257, 1927.

H. Freundlich und L. Farmer Loeb: Biochem. Z. **180**, 141, 1927.

F. Gudzent: Zeitschr. f. physiol. Chem. **89**, 253, 1914; Z. f. klin. Med. **99**, 20, 1924.

A. Jung: Helv. chim. acta **5**, 688, 1922; **6**, 562, 1923; Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **122**, 95, 1927.

R. Kohler: Zeitschr. f. klin. Med. **78**, **87**, **88**, **97**, 381, 1923; Ergebn. d. innern Med. u. Kdhkd. **17**, 473, 1919.

L. Lichtwitz: Zeitschr. f. physiol. Chem. **84**, 416, 1913.

H. Schade und Boden: Z. f. physiol. Chem. **83**, 347, 1913; **86**, 238, 1913.

H. Schade: Z. f. klin. Med. **93**, 1, 1922.

R. Stern: Biochem. Z. **150**, 535, 1924.

E. Tschopp: Biochem. Z. **203**, 267. 1928. (Veraschungsapparat.)